



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 43 26 181 A 1**

⑤ Int. Cl.⁶:
G 01 N 21/64
B 23 K 26/00
G 01 N 15/10

②1 Aktenzeichen: P 43 26 181.7
②2 Anmeldetag: 4. 8. 93
④3 Offenlegungstag: 9. 2. 95

DE 43 26 181 A 1

⑦1 Anmelder:
Europäisches Laboratorium für Molekularbiologie
(EMBL), 69117 Heidelberg, DE

⑦2 Erfinder:
Stelzer, Ernst H.K., Dr., 69126 Heidelberg, DE;
Leclerc, Norbert, Dr., 69120 Heidelberg, DE; Seeger,
Stefan, Dr., 69221 Dossenheim, DE

⑤6 Entgegenhaltungen:
DE 42 39 016 A1
FR 26 28 530 A1
US 50 34 613
EP 04 40 342 A2
EP 03 07 940 A1
EP 00 56 426 A2

Seeger, S.;
et.al.: Application of Laser Optical Tweezers in
Immunology and Molecular Genetics.
In: Cytometry 12, 1991, S.497-504;
MISAWA, Hiroaki;
et.al.: Laser Manipulation and Ablation of a Single
Microcapsule in Water. In: J.An.Chem.Soc. 113,
1991, S.7859-7863;
Stein, Philip G.;
et.al.: Spectre II: General-Purpose Microscope
Input for a Computer. In: Science, Vol.166, S.328-333;
VIGO;
J.;
et. al.: Quantitative microfluorometry of isolated
living cells with pulsed excitation: Development of
an effective and relatively inexpensive instrument.
In: Rev.Sci.Instrum. 58, (8), August 1987, S.1433-1438;
Luxon James T. and David E. Parker: Industrial
Lasers and their Applications, 2. Aufl., 1992, Prentice
Hall Incorp., S. 147-153;

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Verfahren und Vorrichtung zur Lumineszenzspektroskopie und Materialmikrobearbeitung von fixierten und bewegten Molekülen, Partikeln und Objekten

⑤7 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Lumineszenzanalyse und Materialmikrobearbeitung von fixierten und bewegten Molekülen, Partikeln und Objekten. Die Kombination von Lichtdruckkräften zur Fixierung oder Bewegung von Objekten und Fluoreszenzmikroskopie sowie die Kombination mit Materialbearbeitung wird bisher mit mindestens zwei Lichtquellen ausgeführt, zum einen ein Laser, der die Kräfte erzeugt, also als photonische Pinzette dient, zum anderen eine weitere Lichtquelle, z. B. eine Halogenlampe, mit deren Hilfe die Fluoreszenz angeregt wird bzw. eine Lichtquelle, z. B. ein gepulster Stickstofflaser, der zur Materialbearbeitung dient.
Die Verwendung eines gepulsten Lasers, der zerstörungsfrei Objekte fixieren kann, als auch Mehrphotonenanregung von Lumineszenz ermöglicht, und zur Materialmikrobearbeitung genutzt werden kann, führt zu einem einfachen Aufbau mit nur einer Lichtquelle und darüber hinaus zu hoher räumlicher Auflösung in z-Richtung.

DE 43 26 181 A 1

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung mit einem neuartigen Aufbau für die Fixierung oder Bewegung von Objekten und Molekülen und gleichzeitiger Anregung und Beobachtung von Lumineszenz. Darüber hinaus ist die Mikrobearbeitung möglich. Es handelt sich um eine photonische Pinzette, die für Lumineszenzspektroskopie geeignet ist.

Der mechanische Druck von Photonen ist unter Verwendung alltäglicher Lichtquellen wie Glühlampen oder die Sonne nicht meßbar. Erst der Einsatz von Lasern ermöglicht den makroskopischen Nachweis von Kräften auf Oberflächen, die von Photonen herrühren, da Laser Licht mit sehr hoher Photonendichte emittieren. So wurden mit Argonionen-Lasern Atome beschleunigt. Partikel, deren Brechungsindex größer ist, als der der Umgebung, erfahren in der Nähe des Laserstrahls eine Kraft aufgrund der gaußförmigen Intensitätsverteilung des Laserstrahls und werden deshalb in das Zentrum des Laserstrahls beschleunigt. Diese Lichtdruckgradienten lassen sich durch die Fokussierung des Laserstrahls nutzen, um Objekte in den Fokus zu beschleunigen und dort zu fixieren, da hier Lichtdruckkräfte erzeugt werden, die aus allen Richtungen in die Nähe des Fokus gerichtet sind (Ashkin und Dziedzic, Science 235, 1517 (1987)). Wird Licht mit einer Wellenlänge im nahen Infrarot verwendet (z. B. 1064 nm), können auch biologische Partikel mit dieser photonischen Pinzette manipuliert werden, ohne daß das biologische Material zerstört wird, da Licht dieser Wellenlänge nur schwach absorbiert wird (in der Literatur wird die Technik auch optische Pinzette oder optische Falle genannt).

So wurden Bakterien in einem Laserfokus fixiert, Strukturen in lebenden Zellen manipuliert und Zellen oder Chromosomen und Chromosomenfragmente bewegt (z. B. Ashkin und Dziedzic, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 7914 (1989)). Von Visscher et al. wurde eine Mehrstrahlpinzette beschrieben, die mit Spiegeln einen Laserstrahl mit hoher Frequenz auf mehrere Positionen aufteilt und somit Lichtdruckgradienten an mehreren Positionen lokalisiert (Visscher, Brakenhoff und Krol, Cytometry 14, 105–114 (1993)).

Seeger et al. beschrieben erstmals ein Experiment, indem die photonische Pinzette mit Lumineszenztechnik kombiniert wurde. Hier wurden humane T-Helferzellen mit einem Antikörper markiert, an den ein Lumineszenzfarbstoff angekoppelt war. Der Antikörper erkannte und koppelte an die CD4-Struktur auf der Oberfläche von T-Helfer-Zellen. Danach wurde die Lumineszenz mit einer Quecksilberlampe angeregt, und so markierte (T-Helfer-)zellen von nicht markierten Zellen unterschieden. Anschließend konnten T-Helferzellen mit der photonischen Pinzette selektiert werden (Seeger, S. et al. Cytometry 12, 497–504 (1991)).

Ein Nachteil dieses Verfahrens ist, daß neben einer Lichtquelle für die Erzeugung der Lichtdruckgradienten, also der photonischen Pinzette, eine zweite Lichtquelle zur Anregung der Lumineszenz benötigt wird. Entsprechend ist auch eine erhöhte Zahl optischer Bauelemente, z. B. ein Umschaltspiegel oder halbdurchlässiger Spiegel erforderlich. Die Beleuchtung durch eine Lampe erlaubt keine räumliche Auflösung in z-Richtung bei der Lumineszenzmikroskopie.

Die Lösung besteht darin, sowohl für die photonische Pinzette, also die Erzeugung der Lichtdruckkräfte, als auch für die Anregung der Lumineszenz die gleiche Lichtquelle zu verwenden. Für biologische Anwendun-

gen, daß heißt die Manipulation von biologischen Objekten, ist dabei eine Wellenlänge im nahen infraroten Wellenlängenbereich zu wählen, da hier der Absorptionskoeffizient klein genug ist, um bei entsprechend gewählter Laserleistung keine Schädigung des biologischen Materials zu verursachen.

Durch die Fokussierung eines gepulsten Laserstrahls können sehr hohe Photonendichten im Fokus erreicht werden, so daß Mehrphotonenprozesse auftreten. Entsprechend ist es möglich, z. B. Zweiphotonenprozesse zur Anregung von fluoreszierenden Molekülen, Partikeln und Objekten zu nutzen. Geeignete Luminophore, die z. B. als Markermoleküle an Partikel und Makromoleküle gekoppelt sind, können so durch die Strahlung zur Lumineszenz angeregt werden. So kann ein fokussierter, gepulster Laser zur Generierung von Lichtdruckkräften, also als photonische Pinzette genutzt werden, und gleichzeitig zur Anregung von Lumineszenz.

Wird ein Laser benutzt, der sowohl im kontinuierlichen als auch im gepulsten Betrieb arbeitet, kann er im kontinuierlichen Betrieb als photonische Pinzette eingesetzt werden. Im gepulsten Betrieb kann der Laser als photonische Pinzette und gleichzeitig zur Anregung von Lumineszenz genutzt werden. Selbstverständlich kann der Laser auch im gepulsten Betrieb nur als photonische Pinzette eingesetzt werden oder nur zur Anregung von Lumineszenz.

Weiterhin kann auch im gepulsten Betrieb Material bearbeitet oder abgetragen werden. So ist es z. B. möglich, gefüllte Kugeln mit der photonischen Pinzette an einen bestimmten Ort zu transportieren, um dann mit dem gleichen Laser durch Umschalten des Lasers auf gepulsten Betrieb, die Kugel zu zerstören und den Inhalt freizusetzen. Die Kugel kann aber auch im gepulsten Betrieb transportiert werden und dann durch Erhöhung der Pulsleistung zerstört werden. Es ist möglich, mit einem einzigen Laser alle Möglichkeiten, wie photonische Pinzette, Lumineszenzanregung, Materialmikrobearbeitung gleichzeitig oder nacheinander durch Variation der Pulsenergie oder Umschalten des Laserbetriebs von kontinuierlichen oder gepulsten Betrieb zu nutzen, oder eine Auswahl daraus.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Lumineszenzanalyse und Bearbeitung von fixierten und bewegten Molekülen, Partikeln und Objekten, bestehend aus

- a) einer Lichtquelle und Optik zur Herstellung von Lichtdruckgradientenkräften, Anregung von lumineszierenden Molekülen, Partikeln und Objekten und Mikrobearbeitung
- b) einer Abbildungsoptik
- c) einer Strahlpositionierungseinrichtung
- d) einem oder mehreren Spiegeln und/oder Filtern
- e) einem oder mehreren Lumineszenzfarbstoffen, die durch das Licht der Lichtquelle zur Emission von Lumineszenzlicht angeregt werden können.

Als Lichtquellen kommen alle Lichtquellen in Frage, die genügend Leistung besitzen, genügend hohe Photonendichten und Licht bei einer Wellenlänge emittieren, die das Objekt nicht zerstören. Insbesondere sind gepulste Nd:YAG-Laser und Diodenlaser geeignet. So können z. B. Q-switch gepulste Nd:YAG-Laser eingesetzt werden, die sich auch auf kontinuierlichen Betrieb umschalten lassen. Im kontinuierlichen Betrieb kann der Laser als photonische Pinzette eingesetzt werden. Wird der Laser auf gepulsten Betrieb umgeschaltet, so ist

neben den Lichtdruckkräften, also dem Einsatz als photonische Pinzette, gleichzeitig Mehrphotonenanregung von fluoreszierenden Molekülen möglich. Selbstverständlich können auch Laser, die mit anderen Techniken gepulst werden, eingesetzt werden.

Für die Fluoreszenzanregung ist es vorteilhaft, Mehrphotoneneffekte, insbesondere Zweiphotoneneffekte zu nutzen. Dies hat den Vorteil, daß mit z. B. 1064 nm Anregungslicht lumineszierende Moleküle, Partikel und Objekte, deren Absorption um 532 nm liegt, angeregt werden können. Somit kann bei einer Emissionswellenlänge im Bereich von einigen zehn Nanometern über der verdoppelten Anregungswellenlänge (z. B. 570 nm) Streulicht weitgehend diskriminiert werden, da die Photonendichte für eine Zweiphotonanregung nur in einem eng begrenzten Volumen des Laserfokus genügend groß ist. Darüberhinaus läßt sich das Laserlicht aufgrund der sehr unterschiedlichen, weiter im Roten liegenden Wellenlänge sehr gut durch Filter diskriminieren.

Die Nutzung der Mehrphotonenfluoreszenzanregung bietet zudem den Vorteil höherer räumlicher Auflösung in z-Richtung im Vergleich zu gewöhnlicher Anregung der 1-Photonenfluoreszenz, da die Übergangswahrscheinlichkeit für Zweiphotonanregung sich mit dem Quadrat der Intensität verändert. So kann Fluoreszenz in einem kleinen Bereich des Laserfokus angeregt werden.

Darüberhinaus ist diese Technik geeignet, Objekte abzurastern, indem der Laserstrahl mit Hilfe von Spiegeln lateral und das Objekt axial bewegt wird. So kann in drei Dimensionen konfokal gerastert und abgebildet werden.

Der im Folgenden beschriebene Aufbau ermöglicht die Erzeugung von bis zu 10 unabhängigen Strahlen mit einem Laser durch repetitives schnelles Anfahren der gewählten Positionen. Die Positionen sind unabhängig definierbar durch die drei Raumkoordinaten, die Laserleistung, die Auswahl kontinuierlicher Laserbetrieb oder gepulster Betrieb und im Fall von gepulstem Betrieb zusätzlich durch die Repetitionsrate.

Ausführungsbeispiel

Als Abbildungsoptik wird ein handelsübliches inverses Mikroskop verwendet, daß für Fluoreszenzmikroskopie tauglich ist (Fig. 1). Ein diodengepumpter Nd:YAG-Laser, der sowohl im kontinuierlichen als auch gepulsten Modus betrieben werden kann, wird durch den Fluoreszenzeingang über steuerbare Spiegel und einen Umlenkspiegel im Mikroskop in das Mikroskopobjektiv geführt. Durch das Mikroskopobjektiv, durch das das Objekt auch abgebildet wird, wird der Laserstrahl fokussiert. Natürlich kann der Laser auch durch eine zweite fokussierende Optik eingekoppelt werden, die nicht zur Abbildung des Objekts dient. Im kontinuierlichen Betrieb des Nd:YAG-Lasers können mikroskopische Partikel im Fokus fixiert werden. Durch Bewegen des Objektstisches bei fixiertem Laserstrahl oder Bewegen des Laserstrahls z. B. mit Hilfe der Spiegel, kann das fixierte Objekt relativ zu seiner Umgebung bewegt werden und das Instrument kann als photonische Mehrstrahlpinzette eingesetzt werden. Selbstverständlich kann die Einkopplung des Lasers auch ohne steuerbare Spiegel durchgeführt werden.

Wird der Laser im gepulsten Modus betrieben, bleiben die Lichtdruckkräfte bestehen, die Photonendichte wird jedoch soweit erhöht, daß Mehrphotonenanregung von Fluoreszenz möglich ist. So wurden z. B. fluores-

zenzmarkierte Zellen mit dieser Technik fixiert und identifiziert. Darüberhinaus können bei genügend hoher Photonendichte z. B. im Fokus fixierte Latexpartikel zerstört werden.

Beschreibung zur Abb. 1

- 1) axial computergesteuert verstellbarer Objektstisch
- 2) Mikroskopobjektiv
- 3) dichroitischer Spiegel
- 4) Linse in der Epifluoreszenzeinrichtung des Mikroskops
- 5) Anpassungsoptik, die auch eine Rasterung des Objekts erlaubt
- 6) Rasterspiegel, die computergesteuert sind
- 7) Optik zur Strahlanpassung
- 8) Diodengepumpter Nd:YAG Laser, umschaltbar zwischen kontinuierlicher und gütegeschalteter (gepulster) Funktionsweise.

Patentansprüche

1. Verfahren und Vorrichtung zur Lumineszenzanalyse und Materialmikrobearbeitung von fixierten und bewegten Molekülen, Partikeln und Objekten bestehend aus

- a) einer Lichtquelle und Optik zur Herstellung von Lichtdruckgradientenkräften und Anregung von lumineszierenden Molekülen
- b) einer Abbildungsoptik
- c) einer Strahlpositionierungseinrichtung
- d) einem oder mehreren Spiegeln und/oder Filtern
- e) einem oder mehreren Lumineszenzfarbstoffen, die durch das Licht der Lichtquelle zur Emission von Lumineszenzlicht angeregt werden können.

2. Verfahren und Vorrichtung zur Lumineszenzanalyse und Materialmikrobearbeitung von fixierten und bewegten Molekülen, Partikeln und Objekten nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die verwendete Lichtquelle ein Laser ist.

3. Verfahren und Vorrichtung zur Lumineszenzanalyse und Materialmikrobearbeitung von fixierten und bewegten Molekülen, Partikeln und Objekten nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Laser gepulst ist oder zwischen gepulstem und kontinuierlichem Betrieb umschaltbar ist.

4. Verfahren und Vorrichtung zur Lumineszenzanalyse und Materialmikrobearbeitung von fixierten und bewegten Molekülen, Partikeln und Objekten nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere Strahlen eingesetzt werden.

5. Verfahren und Vorrichtung zur Lumineszenzanalyse und Materialmikrobearbeitung von fixierten und bewegten Molekülen, Partikeln und Objekten nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Strahlen computergesteuert positioniert werden.

6. Verfahren und Vorrichtung zur Lumineszenzanalyse und Materialmikrobearbeitung von fixierten und bewegten Molekülen, Partikeln und Objekten nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Strahlen unabhängig voneinander bezüglich der drei Raumkoordinaten, der Laserleistung, der Laserbetriebsart (kontinuierlicher oder gepulster Betrieb), im Fall von gepulstem Betrieb der Repetitionsrate, und unabhängig bezüglich der Laserlei-

stung erzeugt werden können.

7. Verfahren und Vorrichtung zur Lumineszenzanalyse und Materialmikrobearbeitung von fixierten und bewegten Molekülen, Partikeln und Objekten nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Lumineszenzanregung durch Mehrphotoneneffekte verursacht wird.

8. Verfahren und Vorrichtung zur Lumineszenzanalyse und Materialmikrobearbeitung von fixierten und bewegten Molekülen, Partikeln und Objekten nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Objekt und die Lumineszenz konfokal abgebildet werden.

9. Verfahren und Vorrichtung zur Lumineszenzanalyse und Materialmikrobearbeitung von fixierten und bewegten Molekülen, Partikeln und Objekten nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Lumineszenzfarbstoffe eingesetzt werden, die durch Mehrphotoneneffekte angeregt werden können.

10. Verfahren und Vorrichtung zur Lumineszenzanalyse und Materialmikrobearbeitung von fixierten und bewegten Molekülen, Partikeln und Objekten nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Abbildungsoptik ein Mikroskop eingesetzt wird.

11. Verfahren und Vorrichtung zur Lumineszenzanalyse und Materialmikrobearbeitung von fixierten und bewegten Molekülen, Partikeln und Objekten nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Materialmikrobearbeitung mit hoher Pulsleistung durchgeführt wird.

12. Verfahren und Vorrichtung zur Lumineszenzanalyse und Materialmikrobearbeitung von fixierten und bewegten Molekülen, Partikeln und Objekten nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Funktionen photonische Pinzette, Lumineszenzanalyse und Mikromaterialbearbeitung gleichzeitig oder nacheinander oder eine Auswahl daraus gleichzeitig oder nacheinander ausgeführt werden.

13. Verfahren und Vorrichtung zur Lumineszenzanalyse und Materialmikrobearbeitung von fixierten und bewegten Molekülen, Partikeln und Objekten nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß weitere Lichtquellen, insbesondere Laser zur Mikrobearbeitung, gleichzeitig durch die selben optischen Bauelemente fokussiert werden.

14. Verfahren und Vorrichtung zur Lumineszenzanalyse und Materialmikrobearbeitung von fixierten und bewegten Molekülen, Partikeln und Objekten nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der oder die Laser zur Manipulation, Lumineszenzanalyse und Mikrobearbeitung durch die fokussierende Optik eingekoppelt wird, die auch als Abbildungsoptik dient.

15. Verfahren und Vorrichtung zur Lumineszenzanalyse und Materialmikrobearbeitung von fixierten und bewegten Molekülen, Partikeln und Objekten nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der oder die Laser zur Manipulation, Lumineszenzanalyse und Mikrobearbeitung nicht durch die fokussierende Optik eingekoppelt wird, die auch als Abbildungsoptik dient, sondern durch eine zweite fokussierende Optik eingekoppelt wird.

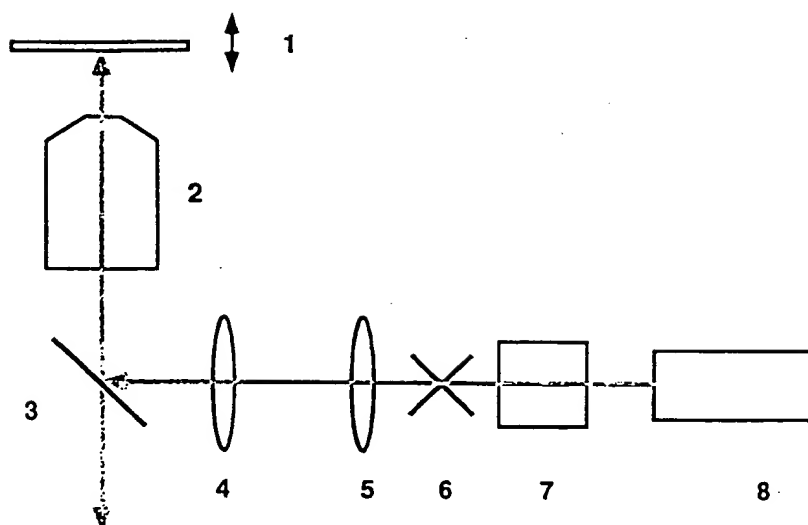
16. Verfahren und Vorrichtung zur Lumineszenzanalyse und Materialmikrobearbeitung von fixierten und bewegten Molekülen, Partikeln und Objekten nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß mit einer oder mehreren Substanzen gefüllte trans-

parente Kugeln transportiert, an einem definierten Ort zerstört und die Substanz freigesetzt wird.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

Fig. 1:



EPAB

CLIPPEDIMAGE= DE004326181A1

PUB-NO: DE004326181A1

DOCUMENT-IDENTIFIER: DE 4326181 A1

TITLE: Method and device for luminescence spectroscopy and material microprocessing of fixed and moving molecules, particles and objects

PUBN-DATE: February 9, 1995

INVENTOR-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
STELZER, ERNST H K DR	DE
LECLERC, NORBERT DR	DE
SEEGER, STEFAN DR	DE

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
EUROP LAB MOLEKULARBIOLOG	DE

APPL-NO: DE04326181

APPL-DATE: August 4, 1993

PRIORITY-DATA: DE04326181A (August 4, 1993)

INT-CL_(IPC): G01N021/64; B23K026/00 ; G01N015/10

EUR-CL (EPC): B23K026/00; G01N021/64

ABSTRACT:

The present invention relates to a method and a device for luminescence analysis and material microprocessing of fixed and moving molecules, particles and objects. The combination of light pressure forces for fixing or moving objects and fluorescence microscopy and the combination with material processing has to date been carried out with at least two light sources, on the one hand a laser which produces the forces, i.e. is used as a photonic forceps (tweezers), and on the other hand a further light source, for example a halogen lamp, with the aid of which the fluorescence is excited or a light source, for example a pulsed nitrogen laser, which is used for material processing.

The use of a pulsed laser which can fix objects without interference and also allows multiphoton excitation of luminescence and can be used for material microprocessing, leads to a simple design with only one light source and, furthermore, leads to high spatial resolution in the z direction.